

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

## **Toll-like Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit Cystischer Fibrose**



Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Marcus Schreiner  
aus  
Deggendorf

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Griesse
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Christian Sommerhoff Priv. Doz. Dr. Michael Weber
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. D. Hartl
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR
Tag der mündlichen Prüfung:	28.10.2008

Meinen Eltern und Großeltern

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
2.1 Neutrophile Granulozyten bei Patienten mit Cystischer Fibrose	5
2.2 Sputuminduktion	5
2.3 Toll-like Rezeptoren	6
2.4 Weitere Rezeptoren	8
2.4.1 Leukotrien B4 Rezeptor 1	8
2.4.2 Komplementrezeptoren 1 und 3	9
<b>3. ZIELSETZUNG</b>	<b>9</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>10</b>
4.1 Patienten	10
4.2 Geräte	10
4.3 Glas- und Plastikmaterial	11
4.4 Antikörper	11
4.5 Stimulantien	11
4.6 Chemikalien und Puffer	12
4.7 Probengewinnung und Verarbeitung	13
4.8 Antikörper-Färbung	13
4.9 Isolierung von humanen neutrophilen Granulozyten	14
4.10 Stimulation von isolierten neutrophilen Granulozyten	14
4.11 Durchflusszytometrie	15
4.12 Auswertung	16
<b>5. ERGEBNISSE</b>	<b>17</b>
5.1 Toll-like Rezeptoren	17
5.1.1 Neutrophile Granulozyten exprimieren TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR9	17
5.1.2 Neutrophile Granulozyten in den Atemwegen von CF Patienten exprimieren verstärkt TLR5	19

# INHALTSVERZEICHNIS

5.1.3 TLR2 Aktivierung induziert TLR5 Expression auf neutrophilen Granulozyten <i>in vitro</i> .....	22
5.2 Leukotrien B4 Rezeptor 1.....	24
5.2.1 Neutrophile Granulozyten in den Atemwegen von CF Patienten exprimieren verstärkt BLT1.....	24
5.2.2 Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit LPS vermindert die BLT1 Expression <i>in vitro</i> .....	25
5.3 Komplementrezeptoren 1 und 3.....	26
5.3.1 Neutrophile Granulozyten in den Atemwegen von CF Patienten exprimieren verstärkt CD11b.....	26
5.3.2 Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> induziert CD11b Expression von neutrophilen Granulozyten <i>in vitro</i> .....	27
5.3.3 Neutrophile Granulozyten in den Atemwegen von CF Patienten zeigen eine geringe CD35 Expression.....	28
5.3.4 CpG-ODN reduzieren die CD35 Expression auf neutrophilen Granulozyten <i>in vitro</i> .....	29
<b>6. DISKUSSION .....</b>	<b>30</b>
6.1 Zusammenfassung.....	30
6.2 Neutrophile Granulozyten bei CF Patienten.....	30
6.3 Toll-like Rezeptoren .....	31
6.4 Leukotrien B4 Rezeptor 1.....	33
6.5 Komplementrezeptoren 1 und 3.....	34
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>36</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>37</b>
<b>9. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>48</b>
<b>10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>48</b>
<b>11. DANKSAGUNG.....</b>	<b>49</b>
<b>12. LEBENSLAUF.....</b>	<b>50</b>

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

## 1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BLT1	Leukotrien B4 Rezeptor 1
BSA	Bovines Serumalbumin
CD35/CR1	Komplementrezeptor 1
CD11b/CR3b	Komplementrezeptor 3b
CpG-ODN	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Oligodesoxynukleotide
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystische-Fibrose-Transmembran-Regulator
COPD	Chronisch obstruktive Lungen-erkrankung
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
et al.	et alias
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
fMLP	N-formyl-Met-Leu-Phe
FSC	Vorwärtsstreulicht
G-CSF	Granulozyten stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	Hydroxylethylpiperazinethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
LBP	LPS-bindendes Protein

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LTA	Lipoteichonsäure
LTB4	Leukotrien B4
MD-2	Myeloid Differenzierungsfaktor 2
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
Min	Minuten
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MyD88	Myeloid Differenzierungsprotein 88
NaCl	Natriumchlorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NF-κB	Nuklearfaktor kappa B
NG	Neutrophile Granulozyten
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	Lipopolypeptid
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphatpuffer)
PE	Phycoerythrin
PGN	Peptidoglycan
PMA	Phorbolmyristatazetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	Pattern-recognition Rezeptor
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SSC	Seitwärtsstreulicht
ssRNA	Einzelstrang-Ribonukleinsäure
TIR	Toll/IL-1 Rezeptordomäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha

## 2. EINLEITUNG

### 2.1 Neutrophile Granulozyten bei Patienten mit Cystischer Fibrose

Die cystische Fibrose (CF) ist die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung der kaukasischen Rasse<sup>53</sup>. Die Lungenerkrankung bestimmt die Morbidität und Mortalität von CF Patienten. Die Atemwege von CF Patienten sind gekennzeichnet durch chronisch bakterielle Infektionen, vor allem durch *Staphylokokkus aureus*, *Haemophilus influenzae* und *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*)<sup>32;33</sup>. Bakterielle Produkte führen zu einem Anstieg der IL-8-Produktion in Bronchialepithelzellen. IL-8 rekrutiert neutrophile Granulozyten (NG) aus der Zirkulation in die Atemwege. NG sind die ersten Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems, die einen Entzündungsherd erreichen. NG besitzen einerseits die Fähigkeit Pathogene zu erkennen als auch die notwendige Ausstattung um Erreger effizient zu beseitigen. Durch die chronische bakterielle Besiedelung kommt es zu einer Ansammlung von NG in den Atemwegen von CF Patienten<sup>6;71</sup>. Bei CF Patienten scheint die Funktion der NG gestört zu sein<sup>7</sup>. Trotz der Akkumulation von NG in den Atemwegen, sind CF Patienten chronisch infiziert mit *P. aeruginosa*<sup>4;31</sup>. Anstatt *P. aeruginosa* abzutöten führen die NG in den CF Atemwegen zu einer überschießenden Entzündungsreaktion. In Verbund mit NG finden sich in den Atemwegen von CF Patienten erhöhte Spiegel der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-1-beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8 und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) bzw. Lipidmediatoren, wie z.B. Leukotrien B4 (LTB4)<sup>7;34;71</sup>. Zusammenfassend bezeichnet man die Entzündungsreaktion der CF Lungenerkrankung als eine chronisch neutrophile Entzündungsreaktion. Die Ursache für die gestörte NG-Funktion in den Atemwegen von CF Patienten ist bislang ungeklärt. Die Analyse von NG aus den Atemwegen von CF Patienten ist somit von hoher Relevanz.

### 2.2 Sputuminduktion

Neben invasiven Methoden wie Lungenbiopsie oder bronchoalveoläre Lavage (BAL)<sup>33</sup>, stellt die Induktion von Sputum eine einfache, nicht-invasive, sichere und reproduzierbare Methode dar, um die neutrophile Entzündungsreaktion in den Atemwegen von CF Patienten zu untersuchen<sup>56;57</sup>. In induziertem Sputum lassen sich nach entsprechender Verarbeitung lösliche Proteine sowie zelluläre Bestandteile analysieren. Durch zahlreiche Studien hat sich die Sputumanalyse als nützliche Methode bei der Untersuchung verschiedener Lungenerkrankungen, wie CF<sup>34</sup>, Tuberkulose<sup>3</sup>, chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) und Asthma<sup>30</sup> etabliert. Aus diesem Grund eignet sich die Sputuminduktion besonders zur Untersuchung der neutrophilen Entzündungsreaktion bei der CF Lungenerkrankung.



## 2.3 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind transmembranöse Rezeptoren, deren zytoplasmatischer Anteil dem des Interleukin 1-Rezeptors sehr ähnelt, weshalb dieser auch Toll/IL-1 Rezeptor-Domäne (TIR) genannt wird. Der extrazelluläre Anteil der Rezeptoren besteht aus leucinreichen Wiederholungen. TLR erkennen eine Vielzahl an Pathogenen anhand ihrer sogenannten pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMP – pathogen-associated molecular pattern), wobei jeder TLR spezifische PAMP erkennt<sup>65</sup>. Der erste TLR wurde in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt<sup>29;55;65</sup>. Medzhitov et al. entdeckten im Jahre 1997 einen homologen Rezeptor im Menschen, der durch Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen das spezifische Immunsystem aktiviert<sup>44</sup>. Poltorak et al. fanden in einer bestimmten Mausmutante, C3H/HeJ, eine Resistenz gegen Lipopolysaccharid (LPS)<sup>50</sup>, einem Bestandteil der Wand Gram negativer Bakterien. Genetische Untersuchungen ergaben eine Punktmutation im Gen für den Rezeptor, der an der Erkennung des LPS beteiligt ist - heute als TLR4 bekannt<sup>29;65</sup>. Insgesamt sind bislang zehn aktive humane TLR beschrieben. Sie werden von diversen Zellen des unspezifischen Immunsystems exprimiert, beispielsweise von dendritischen Zellen, Makrophagen, Mastzellen, Endothelzellen und NG<sup>52;54</sup>, aber auch von B- und T-Zellen des spezifischen Immunsystems<sup>28;63</sup>. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 werden größtenteils extrazellulär exprimiert und sind auf die Erkennung bakterieller Pathogene spezialisiert. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind vorwiegend intrazellulär lokalisiert und detektieren vor allem virale Muster<sup>28</sup>. Einige TLR sind sowohl intrazellulär wie auch an der Zelloberfläche vorhanden, beispielsweise TLR4<sup>72</sup>, TLR3<sup>42</sup> oder TLR2<sup>65</sup>.

TLR1 erkennt native mykobakterielle Lipoproteine, sowie synthetische triazylierte Lipopeptide durch Bildung von Heterodimeren mit TLR2<sup>68</sup>. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass TLR1 an der Erkennung des Oberflächenlipoproteins von *Borrelia burgdorferi* beteiligt ist<sup>2</sup>.

Für TLR2 konnte eine Beteiligung an der Erkennung von Peptidoglycan (PGN) und Lipoteichonsäure (LTA) Gram positiver Bakterien<sup>59;67</sup>, Lipoarabinomannan der mykobakteriellen Zellwand<sup>43;67</sup> und Zymosan aus Hefepilzen gezeigt werden<sup>70</sup>. Für TLR2 ist weithin bekannt, dass dieser im Zuge der Erkennung von Mikroorganismen Heterodimere mit TLR1 und TLR6 auszubilden vermag<sup>49</sup>.

TLR4 bildet bei der Erkennung von LPS einen Molekülkomplex mit dem LPS bindenden Protein (LBP), CD14 und dem Myeloid Differenzierungsfaktor 2 (MD-2)<sup>58</sup>. Weitere bislang bekannte Liganden für TLR4 sind das Hitzeschockprotein (Hsp) 60<sup>48</sup> und Taxol<sup>13</sup>. TLR4 befindet sich hauptsächlich auf Epithelzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, sowie auf anderen Zellen des Immunsystems, z.B. B- und T-Zellen<sup>44</sup> und auch NG<sup>36;47</sup>.

## EINLEITUNG

TLR5 wird auf NG und Epithelzellen exprimiert und erkennt bakterielles Flagellin<sup>25</sup>. In den Atemwegen von CF Patienten ist TLR5 auf Epithelzellen essentiell für die Erkennung von Pathogenen, insbesondere *P.aeruginosa*<sup>74</sup>. Die Bindung von Flagellin an TLR5 auf Epithelzellen führt zur Aktivierung des Nuklearfaktors kappa B (NF-κB) und der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6<sup>51</sup>. TLR5 wurde in NG bereits auf mRNA Ebene detektiert<sup>25</sup>, wurde jedoch auf Proteinebene in NG bislang noch nicht untersucht.

TLR9 erkennt die für Bakterien typische unmethylierte DNA bzw. unmethylierte CpG-Motive<sup>26</sup>. Da der größte Teil der Säuger-DNA methyliert ist, kann so zwischen „Fremd“ und „Eigen“ unterschieden werden. Dass dieser Mechanismus gestört und TLR9 an der Entwicklung autoimmuner Erkrankungen beteiligt sein kann, konnte Leadbetter et al. nachweisen<sup>37</sup>. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass TLR9 neben bakterieller CpG-DNA virale CpG-DNA zu erkennen vermag<sup>35;38</sup>. Die Erkennung setzt eine Internalisierung des zu detektierenden Agens in das späte lysosomale oder endosomale Kompartiment voraus<sup>23</sup>.

Auf mRNA-Ebene wurde die Expression in NG von allen TLR außer TLR3 beschrieben<sup>24</sup>. Auf Proteinebene wurden in NG bislang allerdings nur TLR2 und TLR4 detailliert untersucht. Diese Studien belegen die hohe Aktivität von TLR auf NG. Gleichzeitig deuten sie darauf hin, dass TLR für die Erkennung von Pathogenen durch NG essenziell sind<sup>24;25;36</sup>. Die Rolle von TLR auf NG bei CF Patienten ist bislang unbekannt. Da die CF Lunge durch eine hohe Anzahl an NG und eine chronische bakteriellen Besiedelung gekennzeichnet ist, ist die Untersuchung von TLR auf NG in den Atemwegen von CF Patienten von hoher Relevanz.

Die Tabelle (Tab.)1 zeigt TLR und deren Liganden.

Rezeptoren	Ligand
Heterodimerisation	
TLR2 mit TLR1 und/oder TLR6	Gram positive Bakterien: mykobakterielle 19-kDa Lipoprotein, Peptidoglykan, Lipoteichonsäure, Lipoarabinomannan, Zymosan
TLR3	doppelsträngige (ds) RNA und Viren
TLR4	Lipopolysaccharid, Taxol, Hitzeschockprotein 60
TLR5	Flagellin
TLR7	einsträngige RNA von Viren (z.B. HIV, Influenza Viren), Imiquimod
TLR8	einsträngige RNA von Viren (z.B. HIV, Influenza Viren), Imiquimod
TLR9	Unmethyliertes CpG-Motive von Bakterien und Viren (z.B. Cytomegalievirus)
TLR10	noch nicht bekannt

**Tab.1: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden (Auswahl)**

### 2.4 Weitere Rezeptoren

Neben TLR sind noch weitere Rezeptoren bei der Immunabwehr von NG beteiligt. Während TLR für die Erkennung von Pathogenen zuständig sind<sup>66</sup>, ermöglichen Komplementrezeptoren durch die Bindung von Komplementfaktoren deren Opsonierung und Phagozytose<sup>61</sup>. Leukotrienrezeptoren kommen in erster Linie chemotaktische Aufgaben zu. Über die Bindung bestimmter Mediatoren werden NG mobilisiert und aktiviert<sup>19</sup>. Beide Rezeptorfamilien wurden bereits auf NG charakterisiert. Wir haben die Expression von Leukotrien B4 Rezeptor 1 und Komplementrezeptor 1 und 3 auf NG untersucht und mit der Expression von TLR auf NG der entsprechenden Patienten, bzw. gesunden Kontrollprobanden verglichen.

#### 2.4.1 Leukotrien B4 Rezeptor 1

Im Jahre 1980 wurde Leukotrien B4 (LTB4) erstmals als potenter chemotaktischer Mediator für NG beschrieben<sup>19</sup>. Es handelt sich um ein pro-inflammatorisches Lipid, das mit Hilfe der Lipoxygenase aus Arachidonsäure generiert wird<sup>14</sup>. Bisher sind zwei Leukotrienrezeptoren molekular identifiziert worden, BLT1 und BLT2. Sowohl BLT1 als auch BLT2 sind G-Protein gekoppelte, transmembranöse Rezeptoren. Beide Rezeptoren unterscheiden sich durch ihre Affinität und Spezifität bezüglich ihrer Liganden. BLT1 ist ein hoch-affiner Rezeptor für LTB4, während BLT2 ein niedrig-affiner Rezeptor ist, der auch andere Eicosanoide bindet<sup>14;73</sup>. Durch den Einsatz von LTB4-Rezeptorantagonisten und die gezielte Ausschaltung von BLT1 im Mausmodell ist die Bedeutung von LTB4 für die Regulation von Entzündungsvorgängen gezeigt worden<sup>64</sup>. Auch konnte ihre Beteiligung an der Pathogenität von Entzündungsreaktionen als Aktivatoren von NG belegt werden<sup>27;41;64</sup>. Bei Patienten mit COPD<sup>14;5</sup> und Asthma<sup>27;45</sup> wurde eine verstärkte Expression von BLT1 auf NG beschrieben. Die Rolle von BLT1 auf NG bei CF Patienten ist bislang unbekannt.

#### 2.4.2 Komplementrezeptoren 1 und 3

Die Komplementrezeptoren 1 (CD35/CR1) und 3 (CD11b/CR3b) dienen der Phagozytose und Migration von NG. Sie werden nach Aktivierung durch Mikroorganismen von NG verstärkt exprimiert<sup>9</sup>. Dabei werden sie aus intrazellulären Vesikeln und spezifischen Granula auf die Zelloberfläche transportiert. Die C3b- und iC3b-abhängige Phagozytose von Mikroorganismen stellt einen wichtigen Mechanismus der Abwehr von systemischen Bakterien- und Pilzinfektionen dar<sup>60;61</sup>. Über die spezifische Bindung an Rezeptoren auf NG und Makrophagen opsonieren die Komplementfaktoren C3b und iC3b Partikel. Nach Kontakt mit Pathogenen steigt die Oberflächenexpression von CD35 und CD11b auf NG rapide an<sup>8;10</sup>. Bei CF Patienten wurde

## ZIELSETZUNG

eine hohe Expression von CD11b im peripheren Blut und induziertem Sputum beschrieben<sup>8;9;10</sup>. Es wurde außerdem gezeigt, dass CD35 in CF Atemwegen durch Elastaseaktivität proteolytisch abgebaut wird<sup>31</sup>. Die Rolle der TLR Liganden bei der Modulation von CD11b und CD35 ist bislang noch nicht systematisch untersucht worden.

### 3. ZIELSETZUNG

Wir stellten die Frage ob die Expression von TLR, Komplementrezeptoren und BLT1 auf NG bei Patienten mit CF im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verändert ist. Um diese Frage zu beantworten, quantifizierten wir die Expression von TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR9 auf NG im induzierten Sputum und im peripheren Blut von CF Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Um zu untersuchen, welche Faktoren die TLR Expression in CF Atemwegen modulieren, stimulierten wir isolierte NG aus dem peripheren Blut mit TLR Liganden, Proteasen und pro-inflammatorischen Zytokinen und analysierten die Auswirkungen auf die TLR Expression der NG.

## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Patienten

	CF	Kontrollen
N	35	13
Alter [Jahre]	23 ± 8	22 ± 7
Geschlecht (m/w)	18/17	8/5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> †	35*	0
<i>Staphylokokkus aureus</i> †	13*	0
FEV <sub>1</sub> (% Sollwert)	56 ± 20	n.d.
FVC (%Sollwert)	69 ± 14	n.d.
Neutrophile (%) im Sputum	87 ± 25*	15 ± 3

**Tab.2: Patientendaten**

Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung

m: männlich; w: weiblich

\*p<0.05 verglichen mit Kontrollen

†nachgewiesen in Sputa von *n* CF Patienten

FEV<sub>1</sub>: forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde oder Einsekundenkapazität (% des Sollwerts)

FVC: forcierte Vitalkapazität (% des Sollwerts)

### 4.2 Geräte

- Ultrazentrifuge Varifuge 20 RS Heraeus Sepatech
- Tischzentrifuge 5415C Eppendorf
- Mischgerät: Vortex Genie 2 Scientific Industries
- Mikropipetten Eppendorf  
(0-10µl; 10-100µl; 20-1000µl)
- Durchflusszytometer (FACSScan) Becton & Dickinson
- FACS-Auswertestation Apple  
Macintosh Power PC
- FACS-Auswertesoftware Becton&Dickinson  
Cell Quest 3.1f
- Graph Pad Prism 4.0 Graph Pad Software

## MATERIAL UND METHODEN

### 4.3 Glas- und Plastikmaterial

- Reaktionsgefäße Eppendorf
- Plastikspitzen für Mikropipetten Schubert/Pharmacia
- Plastikröhrchen Falcon  
(15ml/50ml)
- Rundbodenröhrchen „Falcon“ Becton & Dickinson  
(5ml)
- Nitex Gaze (160µm) Becton & Dickinson

### 4.4 Antikörper

- TLR1 - Phycoerythrin (PE) Maus IgG1 (eBioscience, San Diego, USA)
- TLR2 - Fluorescein isothiocyanate (FITC) Maus IgG2a (eBioscience, San Diego, USA)
- TLR4 - PE Maus IgG2a (eBioscience, San Diego, USA)
- TLR5 - PE Maus IgG2a (Imgenex, San Diego, USA)
- TLR9 - PE Ratte IgG2a (eBioscience, San Diego, USA)
- CD11b - PE MausIgG2a (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- CD18 - PE Maus IgG1 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- CD35 - PE Maus IgG1 (Becton & Dickinson, New Jersey, USA)
- LTb4 - PE Maus IgG1 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- Isotyp Kontrolle PE Maus IgG1 (eBioscience, San Diego, USA)
- Isotyp Kontrolle PE Maus IgG2a (eBioscience, San Diego, USA)
- Isotyp Kontrolle FITC Maus IgG2a (eBioscience, San Diego, USA)
- Isotyp Kontrolle PE Ratte IgG2a (eBioscience, San Diego, USA)

### 4.5 Stimulantien

- Rekombinanter Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor - GM-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)
- Rekombinanter Granulozyten stimulierender Faktor - G-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)
- Rekombinantes IL-8 (72aa; PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)
- Rekombinantes IFN- $\gamma$  (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)
- Rekombinanter Tumor Nekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)
- Rekombinantes Flagellin (*P.aeruginosa*) (Inotek Laboratories, London, UK)
- Lipoteichonsäure (LTA) von *B. Subtilis* (Invivogen, San Diego, CA, USA)

## MATERIAL UND METHODEN

- Unmethylierte CpG-Oligonukleotide (CPG-ODN) Typ A (Invivogen, San Diego, CA, USA)
- Synthetisches bakterielles Lipoprotein Pam3CysSerLys4 (Pam<sub>3</sub>Csk<sub>4</sub>) (Invivogen, San Diego, CA, USA)
- Lipopolysaccharid (LPS) (*P.aeruginosa*) (Invivogen, San Diego, CA, USA)

### 4.6 Chemikalien und Puffer

- Phosphatpuffer (PBS) Gibco/Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
  - 10 x stock solution, 1 Liter
    - 80g NaCl
    - 2g KCl
    - 13.06g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O
    - 2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
    - pH 7.3
- Ammoniumchloridpuffer
  - 500 ml
    - 4,15g NH<sub>4</sub>Cl
    - 500mg KHCO<sub>3</sub>
    - 18mg EDTA (Titriplex III)
    - ad 500 ml aqua destillata
- Roswell Park Memorial Institute 1540 (RPMI 1540) Medium Gibco/Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Dithiothreitol (DTT, Sputolysin) (Calbiochem, San Diego, CA, USA).
- Intraprep-Kit (Beckman-Coulter, Miami, USA)
- Percoll ( $\delta = 1.078$  g/ml) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)
- Hydroxyethyl piperazinethansulfonsäure (HEPES) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Phorbolmyristataacetat (PMA) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Ionomycin von *Streptomyces globatus*, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Bovines Serumalbumin (BSA, 0.1%) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

### 4.7 Probengewinnung und Verarbeitung

Vor der Sputuminduktion wurde die Sauerstoffsättigung gemessen, auskultiert, und 2 Hub Sultanol wurden verabreicht. Danach wurde für die Dauer von 15 Minuten (min) mittels eines PARI Kompressors 5ml 5,85% Natriumchlorid (NaCl) vernebelt. Der Speichel wurde in einem getrennten Behälter vor dem Hochhusten des Sputums verworfen. Das Sputum wurde nach 5, 10, 15 min (falls nötig auch zwischenzeitlich) in einen sterilen Sputum-Container (auf Eis bei 4°) gesammelt. Das Volumen des gesamten expektorierten Sputums wurde durch das Hochziehen in einer 20 ml Spritze gemessen. Zur Zellgewinnung wurde das Sputum mit der gleichen Menge 6.5 mM Sputolysin (DTT) versetzt, gevortext und für 20 min in ein auf 37°C temperiertes Schüttelwasserbad gestellt und alle 5 min gemischt. Danach wurde das Suspensionsvolumen abgelesen, mit der gleichen Menge eines 1:1 Gemisches aus 0,9%iger NaCl-Lösung und Sputolysin versetzt, erneut für 10 min im Wasserbad geschüttelt und im Anschluss über Nitex Gaze gefiltert. Die Sputumsuspensionen wurden bei 200 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Größe mit bis zu 2 ml PBS verdünnt und anschließend gevortext. Es wurden PMSF, NaN<sub>3</sub> und BSA zugegeben, um *in vitro* Proteolyse zu vermeiden. 2-4 ml venöses Blut wurde abgenommen und mit Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA) versetzt. Die Proben wurden in 10 ml Falcons gegeben und 1:1 mit PBS verdünnt.

### 4.8 Antikörper-Färbung

Um Oberflächenantigene zytometrisch untersuchen zu können ist es notwendig, diese mit fluorochrom-markierten Antikörpern zu färben. Dabei unterscheidet man die direkte und die indirekte Fluoreszenzfärbung. Bei der direkten Färbung bindet ein fluorochrom-markierter Antikörper direkt an das Antigen. Bei der indirekten Fluoreszenzfärbung bindet zunächst ein Antikörper an das Antigen. Ein zweiter fluorochrom-markierter Antikörper bindet dann an den Antigen-Antikörper-Komplex. Die Fluorochrome haben ein jeweils für sie charakteristisches Exzitations- und Emissionsspektrum. Sie werden mit einem Laserstrahl auf ihrer charakteristischen Exzitationswellenlänge angeregt. Die hierdurch entstehende Emission wird durch Photomultiplier detektiert. Wir haben in dieser Studie ausschließlich mit der direkten Fluoreszenzfärbung gearbeitet. Dazu wurden je 50µl der jeweiligen Suspension in nummerierte Eppendorfgefäße pipettiert und mit 10 µl des monoklonalen direktkonjugierten Antikörpers vermischt, gevortext und 15 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert. Anschließend wurden die so vorbereiteten Proben mit 100 µl Reagenz 1 aus dem Intraprep-Kit versetzt, gevortext und wiederum unter Lichtabschluss für 15 min inkubiert. Danach wurden die Proben mit 1 ml PBS resuspendiert und anschließend für 5 min bei 1300 U/min zentrifugiert.



## MATERIAL UND METHODEN

Der Überstand dieser Suspension wurde verworfen, das Zellpellet der Sputumproben mit 300 µl PBS resuspendiert und für die Durchflusszytometrie in die Rundbodenröhrchen pipettiert und gevortext. Das Zellpellet der Blutproben wurde zur Erythrozytenlyse mit 1ml Ammoniumchloridpuffer versetzt und für 20 min auf Eis unter Lichtabschluss inkubiert. Auf das Zellpellet der mit TLR9 inkubierten Proben wurde 100 µl Reagenz 2 aus dem Intraprep-Kit gegeben. Nach 15 min Inkubation unter Lichtabschluss wurden die Proben ein zweites Mal mit der AK-Lösung behandelt und nach 15 min Inkubationszeit bei Dunkelheit erneut mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen, das jeweilige Zellpellet wie oben beschrieben mit PBS, bzw. Lysierungsreagenz versetzt und zuletzt in für die Durchflusszytometrie in die Rundbodenröhrchen pipettiert und gevortext.

### 4.9 Isolierung von humanen neutrophilen Granulozyten

Es wurden 10-20 ml humanes EDTA-Blut für die Versuche herangezogen. Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Vollblut wurde zunächst in einem 50ml Falcon 1:1 mit PBS verdünnt und anschließend vorsichtig auf 20 ml Percoll geschichtet. Das zweiphasige Gemisch wurde dann 20 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde verworfen, das Röhrchen mit PBS aufgefüllt und die rote Phase resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 1000 U/min wurde nach 10 min nochmals der Überstand abgenommen. Die übrige Zellphase wurde dann mit Ammoniumchloridpuffer versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung ein weiteres Mal bei 1000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet mit der benötigten Menge Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1540 Nährmedium oder in Hanks' balanced salt solution (HBSS) resuspendiert. Die Reinheit der isolierten NG Suspensionen war  $\geq 98\%$  beurteilt durch Zytospin-Präparationen. Die Viabilität der isolierten NG Suspensionen aus dem peripheren Vollblut war  $\geq 95\%$  beurteilt durch den Trypan-Blau Ausschlusstest.

### 4.10 Stimulation von isolierten neutrophilen Granulozyten

Die gewonnene Zellsuspension wurde zunächst auf 2 ml Eppendorfgefäße zu je 1ml verteilt und anschließend mit den TLR Liganden, Phorbolestern, fMLP oder pro-inflammatorischen Zytokinen in folgenden Konzentrationen versetzt:

- PMA ( $10^{-7}\text{M}$ ) / Ionomycin ( $10^{-5}\text{M}$ )
- fMLP (1 µM)
- LTA (10µg/ml; TLR2)
- *P. aeruginosa* LPS (100 ng/ml; TLR4)

## MATERIAL UND METHODEN

- CpG-ODN (100 µg/ml; TLR9)
- Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (10 µg/ml; TLR1/2)
- *P. aeruginosa* flagellin (1 µg/ml; TLR5)
- rekombinant humanes IL-8 (72aa, 50 ng/ml)
- rekombinant humanes G-CSF (100 ng/ml)
- rekombinant humanes GM-CSF (100 ng/ml)
- rekombinant humanes IFN-γ (1000 units/ml)
- rekombinant humanes TNF-α (50 ng/ml).

Dazu wurden die Zellen in den verschlossenen Gefäßen für 30 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Eppendorfgefäß mit PBS aufgefüllt und für 5 min bei 1300 U/min in die Zentrifuge gegeben. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet mit PBS resuspendiert und für die Antikörperbehandlung zu je 100 µl auf 1,5 ml Eppendorfgefäße verteilt.

### 4.11 Durchflusszytometrie

Das FACS-Gerät besteht aus 3 Einheiten: Flüssigkeitssystem, Optiksystem und Umwandlungssystem.

#### Flüssigkeitssystem:

Mit dem Einlegen der Probe in das FACS-Gerät wird die Zellsuspension von einer Trägerflüssigkeit beschleunigt („Hydrodynamische Fokussierung“). Die Zellen werden dabei im Messpunkt fokussiert, passieren ihn einzeln und werden dabei vom Laser erfasst.

#### Optiksystem:

Das Detektionssystem besteht aus dem Bereich zur Messung des Vorwärtstreulichtes (FSC= Forward angle light scatter), dem Bereich zur Messung des Seitwärtstreulichtes (SSC= Side angle light scatter) und der spezifischen Fluoreszenz für jedes einzelne Fluorochrom. Abhängig von den unterschiedlichen physikalischen Zellparameter wie Größe, Granularität und Membranstruktur wird der Laserstrahl verschieden stark abgelenkt. Der FSC- Lichtstrahl der die Zellen axial trifft korreliert mit der Zellgröße, während der orthogonal die Zellen treffende SSC- Lichtstrahl mit der Granularität und äußeren Zellform korreliert.

## MATERIAL UND METHODEN

### Umwandlungssystem:

Die so entstehenden optischen Signale können mit Hilfe äußerst empfindlicher Photodetektoren und Photodioden in elektrische Signale umgewandelt werden. Mittels Software können diese graphisch dargestellt und ausgewertet werden.

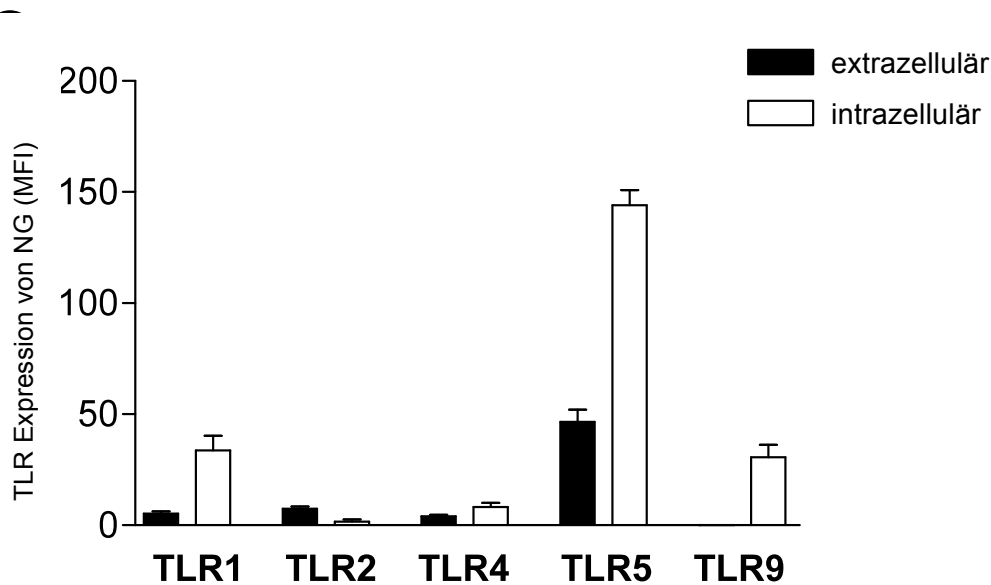
### **4.12 Auswertung**

Die statistische und graphische Auswertung erfolgte mit Prism 4.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Die FACS Datenauswertung erfolgte mit Cell Quest 3.1f (Becton & Dickinson).

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1 Toll-like Rezeptoren

#### 5.1.1 Neutrophile Granulozyten exprimieren TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR9

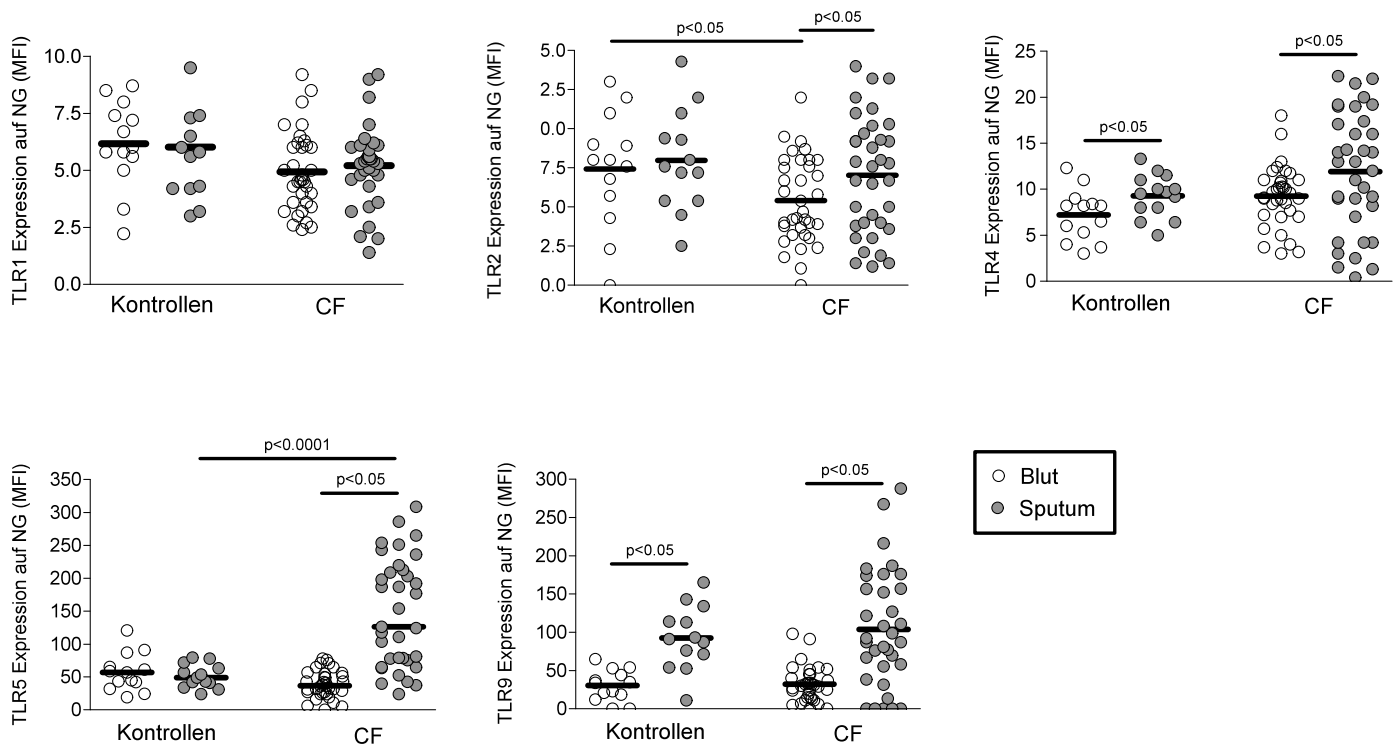


**Abbildung (Abb.) 1:** Extrazelluläre und intrazelluläre TLR Expression auf NG im peripheren Blut  
*MFI: mittlere Fluoreszenzintensität*

Um die TLR Expression auf NG zu charakterisieren, wurde zunächst die extra- und intrazelluläre TLR Expression auf NG im peripheren Blut von gesunden Kontrollprobanden untersucht. TLR1, TLR2 und TLR4 waren im peripheren Blut sowohl extrazellulär als auch intrazellulär in geringem Maße auf NG exprimiert. TLR5 zeigte eine hohe Expression auf NG im peripheren Blut. TLR5 war unter allen TLR sowohl extrazellulär als auch intrazellulär am höchsten exprimiert. NG exprimierten TLR9 im peripheren Blut ausschließlich intrazellulär.

Diese Ergebnisse zeigen, dass NG TLR intrazellulär speichern können, und legen im Besonderen eine wichtige Rolle von TLR5 auf NG nahe.

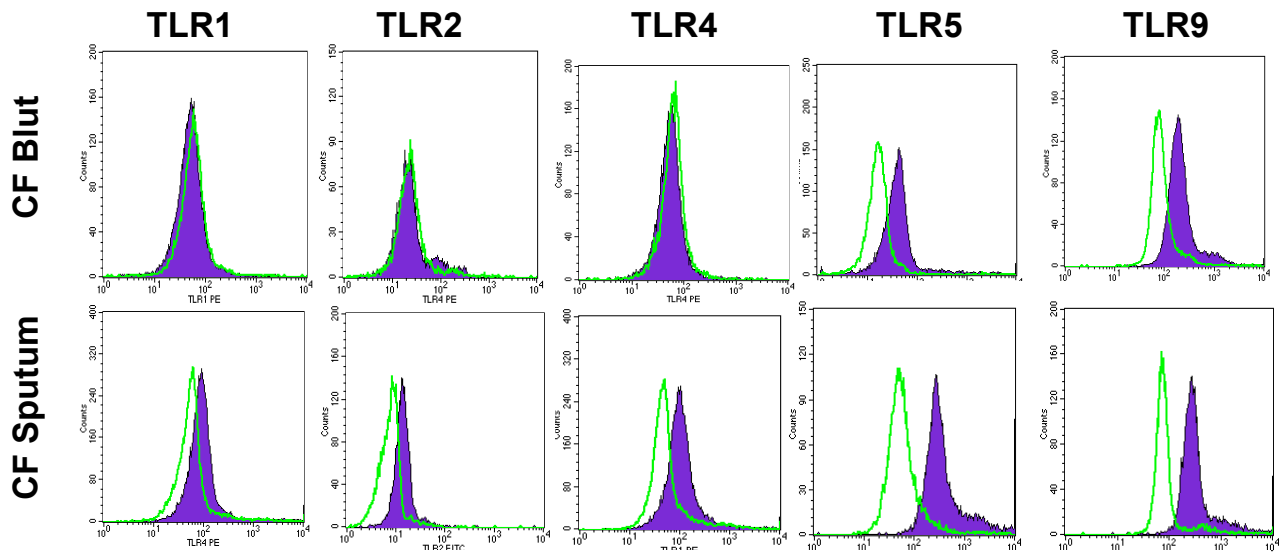
## ERGEBNISSE



**Abb.2:** TLR Expression von NG im peripheren Blut und induziertem Sputum bei CF Patienten und gesunden Kontrollprobanden. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität

Wir untersuchten die Oberflächenexpression der verschiedenen TLR auf NG von CF Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Dabei verglichen wir jeweils peripheres Blut und induziertes Sputum. Im peripheren Blut war nur TLR2 bei CF Patienten signifikant niedriger exprimiert im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Ansonsten fanden sich keine Unterschiede im peripheren Blut zwischen Kontrollen und CF Patienten. TLR2, TLR4, TLR5 und TLR9 waren im induzierten Sputum höher exprimiert als im peripheren Blut. Dies war vor allem deutlich für TLR5 und TLR9. Bei TLR4 und TLR9 fand sich eine erhöhte Expression im induzierten Sputum im Vergleich zu peripherem Blut auch für gesunde Kontrollen, während bei TLR2 und TLR5 ausschließlich bei CF Patienten eine erhöhte Expression im induzierten Sputum verglichen mit peripherem Blut gefunden wurde. Wenn wir die Expressionen der TLR im induzierten Sputum zwischen Kontrollen und CF Patienten statistisch verglichen, fand sich nur ein Unterschied bei TLR5. Die TLR1, TLR2, TLR4 oder TLR9 Expression im induzierten Sputum unterschied sich nicht zwischen gesunden Kontrollen und CF Patienten. Die TLR5 Expression im induzierten Sputum war bei CF Patienten allerdings deutlich erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass spezifisch die Expression von TLR5 auf NG in den Atemwegen von CF Patienten induziert wird.

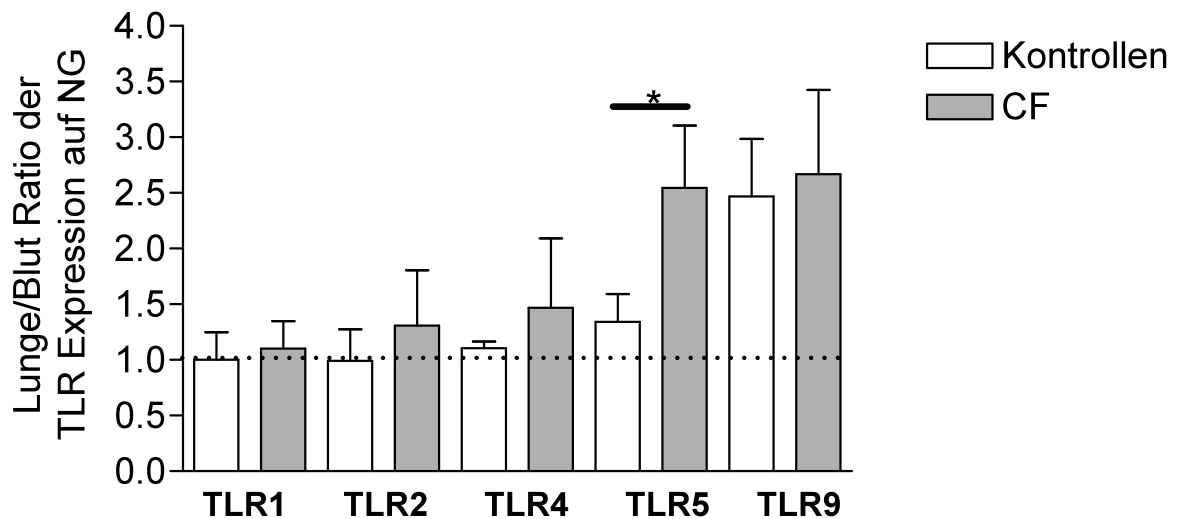
### 5.1.2 Neutrophile Granulozyten in den Atemwegen von CF Patienten exprimieren verstärkt TLR5



**Abb.3: TLR Expression im peripheren Blut und induzierten Sputum von CF Patienten.**

Unter allen TLR zeigte TLR5 auf NG im Sputum, verglichen mit peripheren Blut von CF Patienten, die am deutlichsten erhöhte Expression. Abbildung 3 zeigt exemplarisch die Expression der untersuchten TLR im peripheren Blut und in den Atemwegen (induziertem Sputum) von CF Patienten. Zu beachten ist die deutlich höhere Expression von TLR5 auf NG in CF Atemwegen im Vergleich zu peripherem Blut.

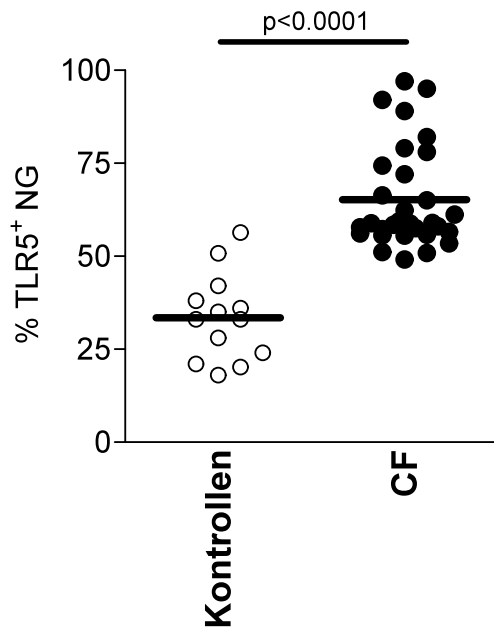
## ERGEBNISSE



**Abb.4: Lunge zu Blut Ratio bei CF Patienten und gesunden Kontrollen**

Wenn man aus den Expressionen der einzelnen TLRs im induzierten Sputum und peripheren Blut Verhältnisse (Ratios) berechnet, findet sich ausschließlich für TLR5 ein signifikanter Unterschied zwischen CF Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Die TLR9 Expression im induzierten Sputum ist deutlich erhöht im Vergleich zu peripherem Blut. Allerdings besteht kein Unterschied zwischen CF Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Diese Ergebnisse deuten erneut darauf hin, dass die Expression von TLR5 spezifisch in den Atemwegen von CF Patienten hochreguliert wird. \* $p < 0.05$  CF Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

## ERGEBNISSE



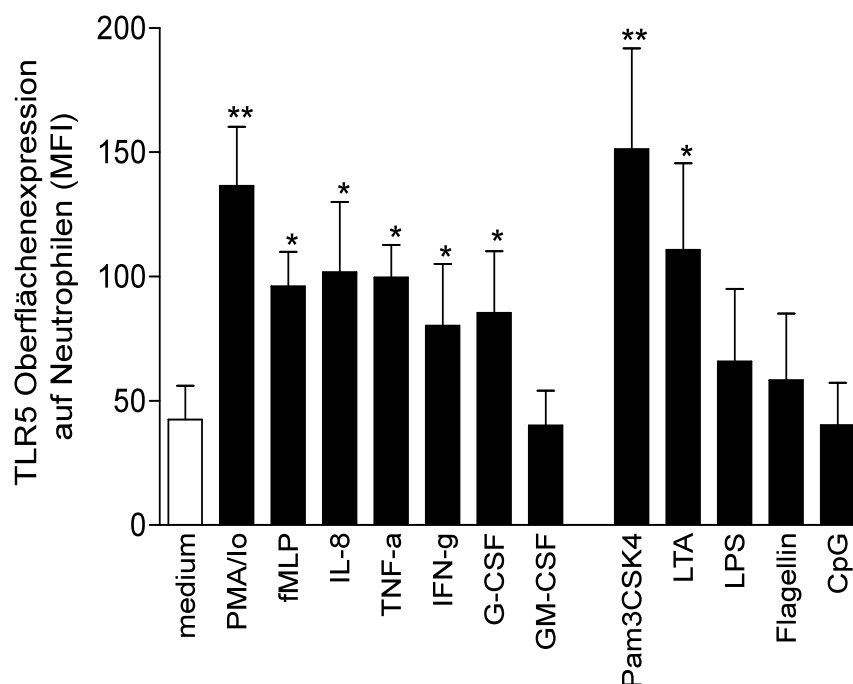
**Abb.5:** TLR5<sup>+</sup> NG im induzierten Sputum bei CF Patienten und gesunden Kontrollprobanden

Bei der isolierten Betrachtung von TLR5 im induzierten Sputum fanden wir deutlich höhere Prozentsätze von TLR5<sup>+</sup> NG bei CF Patienten als bei gesunden Kontrollprobanden. Dies bedeutet, dass nicht nur die Oberflächenexpression von TLR5 auf NG bei CF Patienten erhöht ist, sondern auch eine Ansammlung TLR5<sup>+</sup> NG in CF Atemwegen auftritt.



## ERGEBNISSE

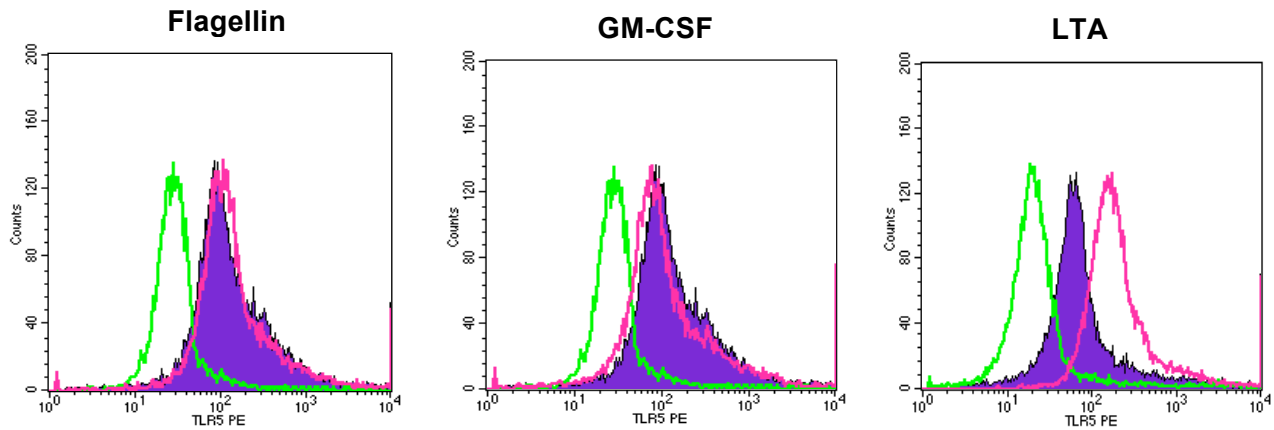
### 5.1.3 TLR2 Aktivierung induziert TLR5 Expression auf neutrophilen Granulozyten *in vitro*



**Abb.6:** TLR5 Expression vor und nach Stimulation.

Um zu untersuchen, welche Faktoren in CF Atemwegen die Expression von TLR5 induzieren können, stimulierten wir isolierte NG aus dem peripheren Blut mit verschiedenen CF-relevanten pro-inflammatorischen Proteinen. Es wurden isolierte NG aus peripherem Kontrollblut mit Medium oder TLR Liganden, Zytokinen oder NG-Aktivatoren (PMA, fMLP) behandelt und die Wirkung dieser Stimulation auf die TLR5 Oberflächenexpression analysiert. Dabei fanden wir nach der Behandlung der NG mit PMA/Ionomycin und fMLP sowie den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-8, TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  eine Zunahme der TLR5 Oberflächenexpression. Interessanterweise fanden wir eine erhöhte Expression von TLR5 nach Stimulation mit G-CSF, während GM-CSF die Expression tendenziell reduzierte. Unter den TLR Liganden, fand sich eine erhöhte Expression nach Stimulation mit den TLR2 Liganden LTA und Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> im Vergleich zu nicht stimulierten NG. LPS, Flagellin und CpG zeigten keinen signifikanten Effekt auf die TLR5 Oberflächenexpression. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  im Vergleich zu Medium-behandelten NG.

## ERGEBNISSE

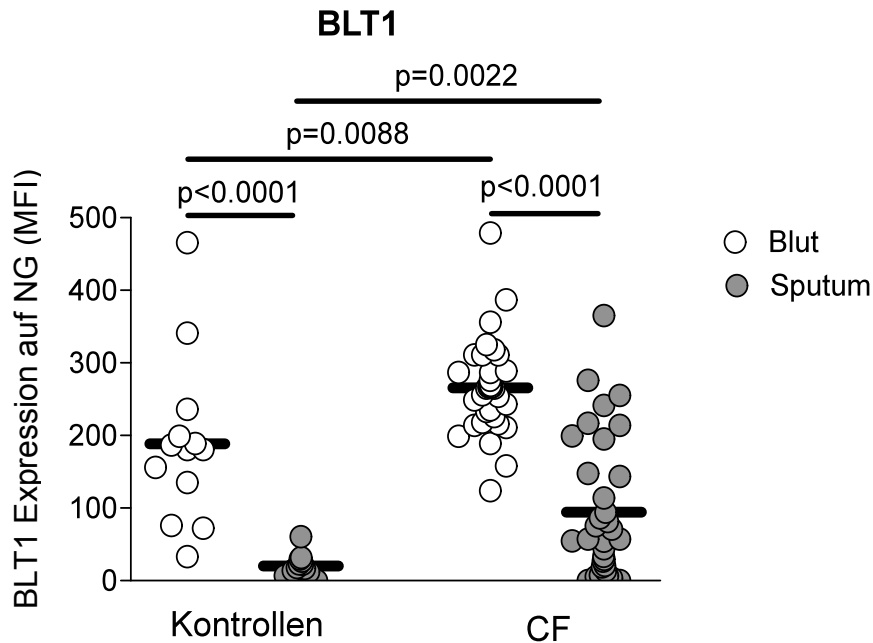


**Abb.7:** *TLR5 Expression nach Inkubation mit verschiedenen TLR Liganden.*

Abbildung 7 zeigt exemplarisch die TLR5 Oberflächenexpression nach Stimulation von NG mit Flagellin, GM-CSF oder LTA. Das ausgefüllte Histogramm in lila zeigt die Fluoreszenzintensität von TLR5 auf NG nach Medium-Inkubation. Die grünen Histogrammkurven entsprechen den Isotypkontrollen, die roten/pinken Kurven der Fluoreszenzintensität von TLR5 nach halbstündiger Behandlung mit dem jeweiligen Agens. Es fand sich eine deutlich erhöhte Expression von TLR5 auf NG nach Inkubation mit LTA im Vergleich zu nicht stimulierten NG.

## 5.2 Leukotrien B4 Rezeptor 1

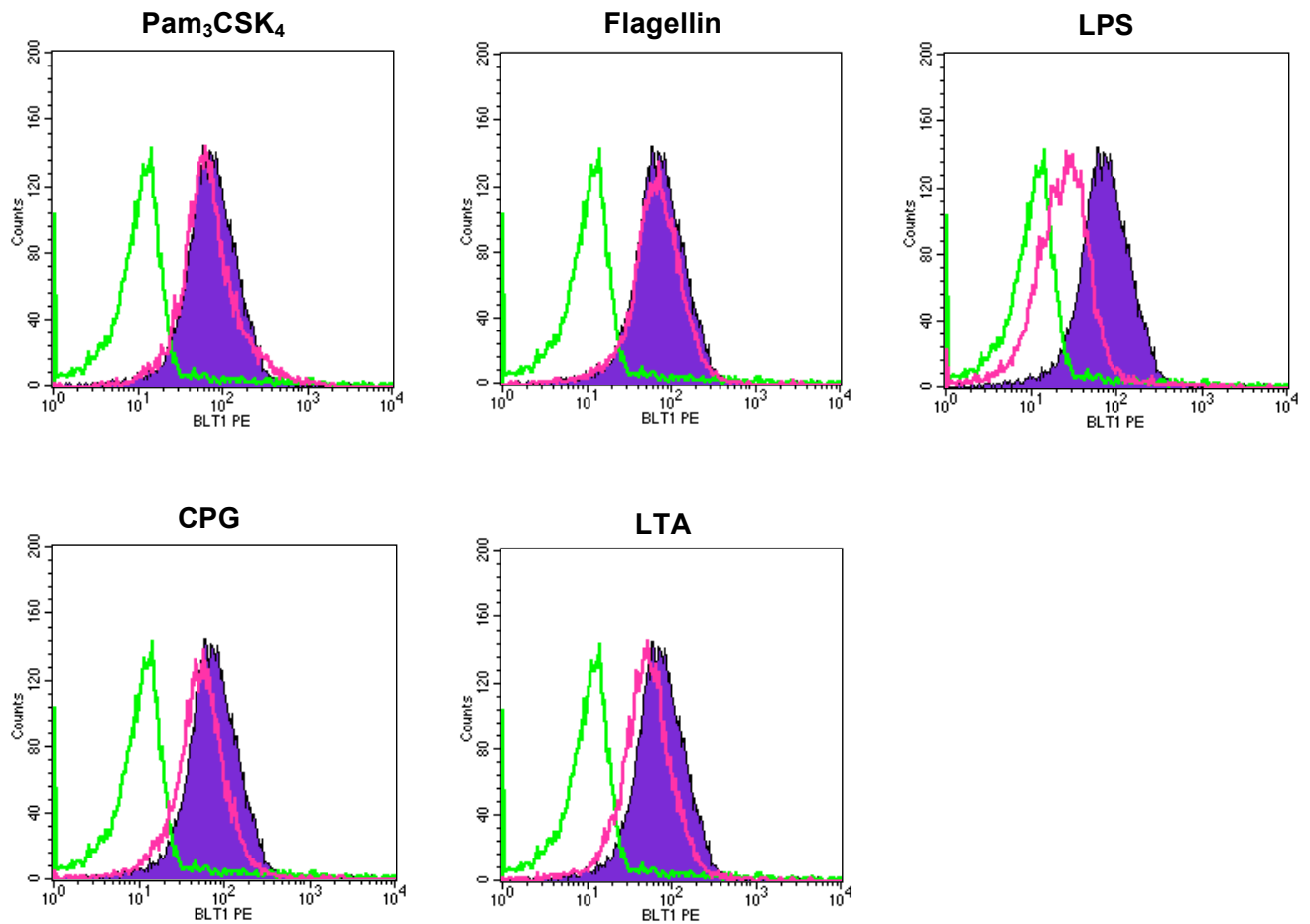
### 5.2.1 Neutrophile Granulozyten in den Atemwegen von CF Patienten exprimieren verstärkt BLT1



**Abb.8:** BLT1 Expression auf NG im peripheren Blut und induzierten Sputum bei CF Patienten und Kontrollprobanden. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität

Die BLT1 Expression auf NG war im induzierten Sputum sowohl bei Kontrollprobanden als auch bei CF Patienten verglichen mit peripheren Blut deutlich erniedrigt. Bei CF Patienten exprimierten NG stärker BLT1 als bei gesunden Probanden. Insbesondere in den Atemwegen war BLT1 bei CF Patienten signifikant höher exprimiert als bei den Kontrollen. Diese Ergebnisse zeigen, dass der LTB4 Rezeptor 1 bei CF Patienten im Generellen erhöht ist.

### 5.2.2 Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit LPS vermindert die BLT1 Expression *in vitro*

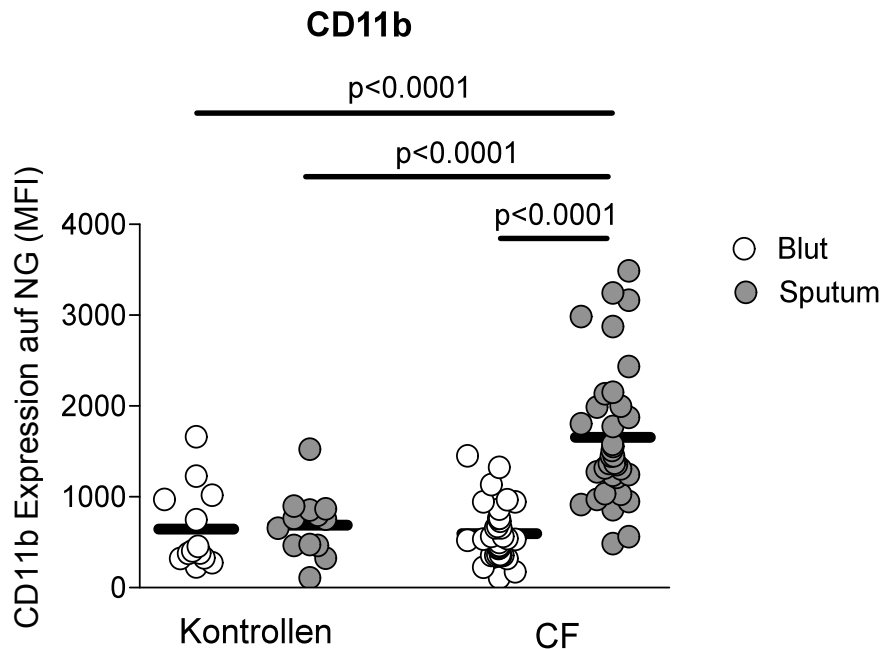


**Abb.9:** BLT1 Expression nach Inkubation mit verschiedenen TLR Liganden.

Abbildung 9 zeigt die Expression von BLT1 auf isolierten NG nach Behandlung mit dem jeweiligen TLR Liganden. Im Vergleich zu unbehandelten NG zeigte BLT1 nach Stimulation mit LPS nur noch ca. 20% der ursprünglichen Fluoreszenzintensität. Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, Flagellin, CpG-ODN und LTA bewirkten dagegen keine signifikanten Veränderungen der BLT1 Expression auf NG. Die grüne Histogrammkurve entspricht der Isotypkontrolle. Das ausgefüllte Histogramm in lila zeigt die Fluoreszenzintensität von BLT1 auf NG nach Medium-Inkubation. Die roten/pinken Kurven zeigen die Fluoreszenzintensität von BLT1 nach halbstündiger Behandlung mit dem jeweiligen Agens.

### 5.3 Komplementrezeptoren 1 und 3

#### 5.3.1 Neutrophile Granulozyten in den Atemwegen von CF Patienten exprimieren verstärkt CD11b



**Abb.10:** CD11b Expression auf NG im induzierten Sputum und im peripheren Blut von CF Patienten und Kontrollprobanden. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität

Die Expression von CD11b auf NG war im induzierten Sputum von CF Patienten mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von durchschnittlich 1800 deutlich höher als in deren peripheren Blut (MFI:  $\bar{x}$  700). Die CD11b Expression auf NG in den Atemwegen und im peripheren Blut von den gesunden Kontrollprobanden unterschied sich dagegen nicht signifikant von der CD11b Expression im peripheren Blut von CF Patienten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass lokale Faktoren in den Atemwegen von CF Patienten die Oberflächenexpression von CD11b steigern. Wir analysierten deshalb *in vitro* welche CF-relevanten Proteine dafür verantwortlich sein könnten.

### 5.3.2 Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> induziert CD11b Expression von neutrophilen Granulozyten *in vitro*

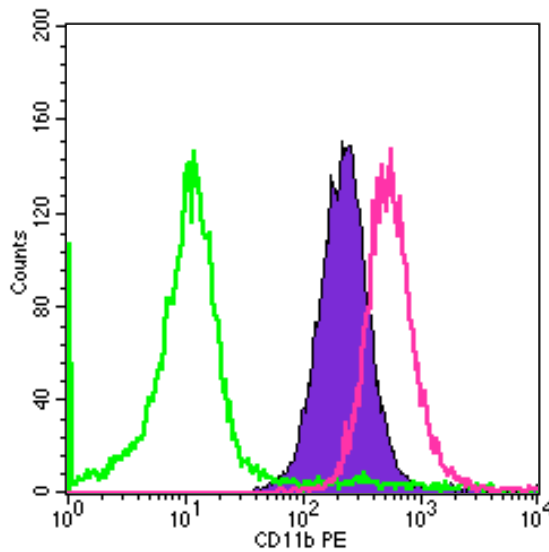
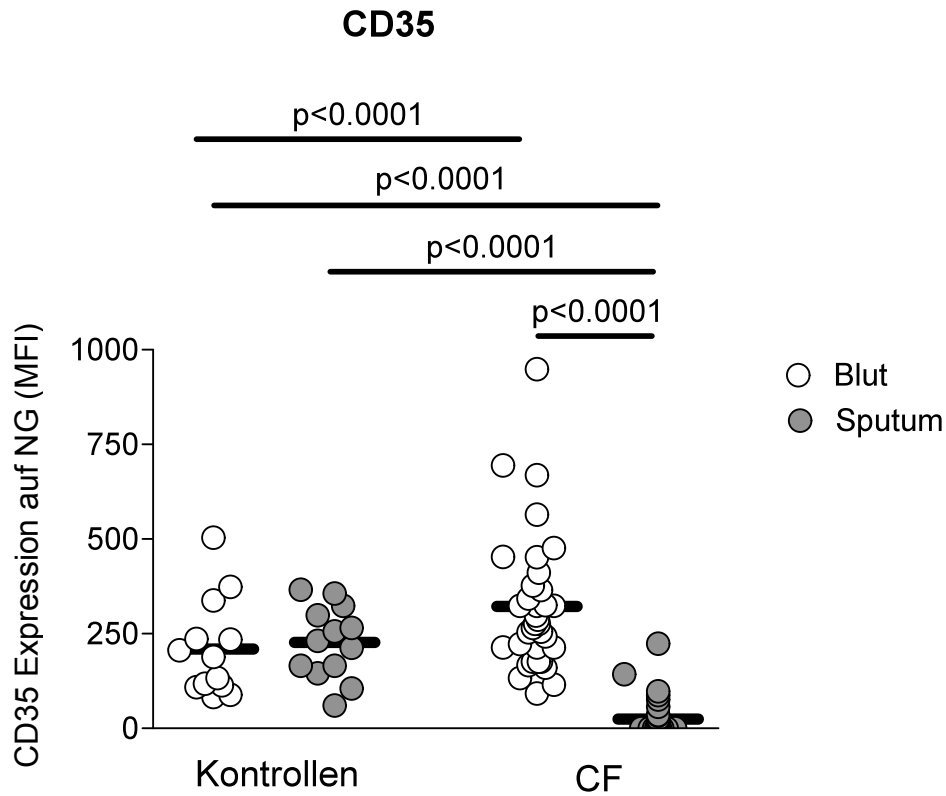


Abb.11: FACS Histogramm von CD11b

Nach Behandlung von isolierten NG mit Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> war die Oberflächenexpression von CD11b deutlich höher als bei unstimulierten NG. Im Vergleich zum Medium hat sich die CD11b Expression verdoppelt. Weitere TLR Liganden (siehe BLT1 Experimente oben) zeigten keine oder abgeschwächte Effekte auf die CD11b Expression. Die grüne Histogrammkurve entspricht der Isotypkontrolle. Das ausgefüllte Histogramm in lila zeigt die Fluoreszenzintensität von CD11b auf NG nach Medium-Inkubation. Die roten/pinke Kurve zeigt die Fluoreszenzintensität von CD11b nach halbstündiger Behandlung mit Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>. Diese Ergebnisse legen nahe, dass TLR2 Liganden, wie hier am Beispiel von Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> gezeigt, für die gesteigerte Oberflächenexpression von CD11b in CF Atemwegen verantwortlich sein könnten.

### 5.3.3 Neutrophile Granulozyten in den Atemwegen von CF Patienten zeigen eine geringe CD35 Expression



***Abb.12:*** CD35 Expression auf NG im induzierten Sputum und im peripheren Blut von CF Patienten und Kontrollprobanden. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität

Die Expression von CD35 auf NG war im induzierten Sputum von CF Patienten deutlich niedriger als im peripheren Blut und bei Kontrollprobanden. In den allermeisten Fällen zeigten NG aus CF Atemwegen keinerlei nachweisbare Expression von CD35, während im peripheren Blut von CF Patienten CD35 auf NG im Vergleich zu den gesunden Probanden erhöht war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass lokale Faktoren in CF Atemwegen die Expression von CD35 erniedrigen. Wir untersuchten deshalb, welche CF-relevanten Proteine dafür verantwortlich sein könnten.

### 5.3.4 CpG-ODN reduzieren die CD35 Expression auf neutrophilen Granulozyten *in vitro*

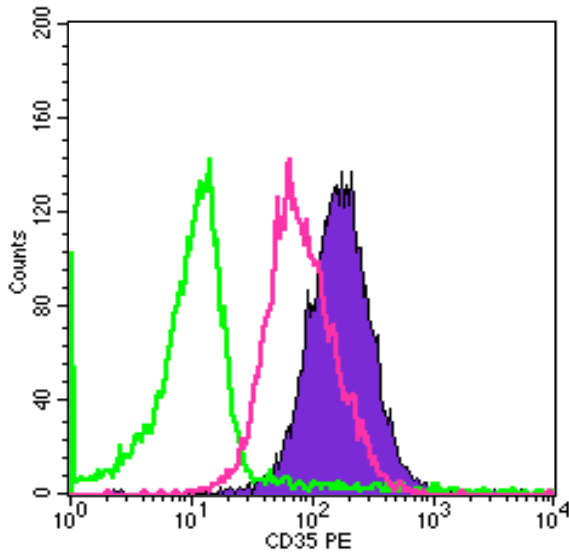


Abb.13: FACS Histogramm von CD35

Abbildung 13 zeigt die Oberflächenexpression von CD35 auf NG nach Behandlung mit dem TLR9 Liganden CpG-ODN im Vergleich zum Medium. Unstimuliert erreichte die mittlere Fluoreszenzintensität von CD35 auf NG einen Wert von 150. Nach halbstündiger Inkubation mit isolierten CpG-DNA Motiven zeigte CD35 nur noch einen Wert von ca. 50. Weitere TLR Liganden (siehe BLT1 Experimente oben) zeigten keine oder abgeschwächte Effekte auf die CD35 Expression. Die grüne Histogrammkurve entspricht der Isotypkontrolle. Das ausgefüllte Histogramm in lila zeigt die Fluoreszenzintensität von CD35 auf NG nach halbstündiger Behandlung mit CpG-ODN. Die rote/pinke Kurve zeigt die Fluoreszenzintensität von CD35 nach Medium-Inkubation. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass TLR9 Aktivierung zu einer Abnahme von CD35 auf NG führt.



## 6. DISKUSSION

### 6.1 Zusammenfassung

Im Rahmen unserer Studie fanden wir eine höhere TLR5 Expression auf NG im Vergleich zu TLR1, TLR2, TLR4 und TLR9. TLR5 war bei NG sowohl im Zytoplasma als auch auf der Zelloberfläche exprimiert. Die Atemwege von CF Patienten waren durch eine erhöhte TLR5 Oberflächenexpression als auch durch eine Ansammlung von TLR5<sup>+</sup> NG charakterisiert. *In vitro* führte die Stimulation von NG mit TLR2 Liganden als auch mit CF-assoziierten pro-inflammatorischen Zytokinen zu einer erhöhten Oberflächenexpression von TLR5 auf NG. Weiterhin fanden wir, dass NG in den Atemwegen von CF Patienten eine erhöhte Oberflächenexpression von BLT1 und CD11b und eine verminderte Expression von CD35 im Vergleich zu gesunden Probanden zeigten. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass insbesondere TLR5 auf NG eine herausragende Rolle bei der antibakteriellen Immunabwehr von CF Patienten mit *P. aeruginosa* Infektion spielt.

### 6.2 Neutrophile Granulozyten bei CF Patienten

Im Zuge der angeborenen Immunreaktion kommt es bei CF Patienten zu einer Rekrutierung großer Mengen von NG in den Atemwegen<sup>6;32;33</sup>. Trotz der anhaltenden Präsenz von NG wird die Mehrheit der Lungen von CF Patienten schon im frühen Alter mit Bakterien besiedelt. Meist bleibt dieser Zustand ein Leben lang erhalten<sup>4;31</sup>. Eine Mutation des Cystische Fibrose Transmembran Regulator (CFTR) Proteins wird mit der überschießenden Produktion von pro-inflammatorischen Mediatoren bei CF Patienten in Verbindung gebracht<sup>7;71</sup>. Mäuse mit defektem CFTR Protein haben deutlich weniger ausgeprägte Krankheitssymptome der Lunge als CF Patienten<sup>22</sup>. CF Patienten haben außerdem keine relevanten systemischen Immundefekte, wohingegen ihre pulmonale Immunantwort nicht in der Lage ist, die Atemwege vor bakterieller Besiedelung zu bewahren<sup>4;15</sup>. Zahlreiche Hinweise deuten in diesem Sinne darauf hin, dass die neutrophile Lungenerkrankung von CF Patienten nicht primär durch eine Mutation im CFTR Gen verursacht wird, da NG CFTR gar nicht oder nur in sehr niedrigen Mengen exprimieren<sup>46</sup>. NG im peripheren Blut von CF Patienten weisen außerdem nur sehr geringe Unterschiede zu NG von gesunden Kontrollen auf, wohingegen NG aus CF Atemwegen deutliche Unterschiede zu NG aus gesunden Atemwegen zeigen. NG aus CF Atemwegen zeigen eine deutliche Schwäche, Bakterien abzutöten. In Zusammenschau dieser Vorbefunde ist es wahrscheinlich, dass NG selbst durch die anhaltende Entzündung in ihrer Funktion verändert werden<sup>7</sup>. NG werden durch deren Oberflächenrezeptorexpression charakterisiert. Wir untersuchten deshalb die Oberflächenexpression von Rezeptoren der angeborenen Immunantwort (Toll-like Rezeptoren,

## DISKUSSION

Komplementrezeptoren und den LTB<sub>4</sub>-Rezeptor 1) auf NG im peripheren Blut und in den Atemwegen von CF Patienten und gesunden Kontrollprobanden, um die Ursache(n) der gestörten Funktion der NG in CF Atemwegen besser zu verstehen.

### 6.3 Toll-like Rezeptoren

TLR wurden als die wichtigsten Mustererkennungsrezeptoren / Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) auf NG beschrieben<sup>24</sup>. NG erkennen Bakterien über die Bindung an TLR. Wenn Bakterien über TLR erkannt werden sind NG in der Lage, vorhandene Pathogene zu phagozytieren und intrazellulär abzutöten. Frühere Studien haben gezeigt, dass NG auf mRNA Ebene alle TLRs außer TLR3 exprimieren. Dies mag auf der Tatsache beruhen, dass TLR3 in erster Linie viral-assoziierte ssRNA erkennt und NG hauptsächlich antibakterielle Funktionen besitzen. Auf Proteinebene ist die Expression von TLR1, TLR2, TLR4 und TLR9 auf NG bereits beschrieben worden<sup>24,47</sup>. Die Expression von TLR5 auf NG ist bislang nicht untersucht worden. Wir haben die Expression von TLR auf Proteinebene sowohl bei gesunden Probanden (peripheres Blut) als auch am Ort bakterieller Entzündung (Sputum von CF Patienten) untersucht. Unter Verwendung der Durchflusszytometrie haben wir zum ersten Mal gezeigt, dass TLR5 auf Proteinebene den am stärksten exprimierten TLR auf NG darstellt. TLR5 besitzt eine 5- bis 10-fach höhere Fluoreszenzintensität auf der Oberfläche von NG verglichen mit der moderaten Expression von TLR1, TLR2 und TLR4. Dies führte uns zu der Hypothese, dass gerade TLR5 auf NG eine entscheidende Rolle in der antibakteriellen Immunität von NG in CF Atemwegen spielen könnte.

Die TLR5 Oberflächenexpression auf NG im peripheren Blut war bei gesunden Probanden und CF Patienten nahezu identisch. In den Atemwegen von CF Patienten dagegen zeigt TLR5 eine bemerkenswert höhere Expression auf NG von CF Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen, während TLR1, TLR2 und TLR4 in beiden Fällen schwach exprimiert waren. Dabei zeigten TLR1, TLR2 und TLR4 nur Unterschiede zwischen NG aus den Atemwegen und dem peripheren Blut aber keine Unterschiede zwischen Atemwegs-NG bei CF- und Kontrollprobanden. Die relativ geringe Expression von TLR4 auf NG in CF Atemwegen im Vergleich zu TLR5 könnte auf die dort vorhandene hohe Elastasenaktivität zurückzuführen sein, welche TLR4 erniedrigen kann<sup>16</sup>.

TLR5 erkennt Flagellin, den Hauptbestandteil von bakteriellem Flagellum, das einen wichtigen Virulenzfaktor sowohl für Gram positive als auch für Gram negative Bakterien darstellt<sup>25</sup>. So wie auch andere Pathogene in den Atemwegen benutzt *P. aeruginosa* für die Fortbewegung Flagella<sup>17</sup>. Nach Bindung von Flagellin an TLR5 auf Epithelzellen wird über die Aktivierung des Myeloid Differenzierungsproteins 88 (MyD88) eine pro-inflammatorische

## DISKUSSION

Zellantwort durch Mobilisation von NF- $\kappa$ B und Produktion von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-6 ausgelöst<sup>25;51</sup>. Bislang gibt es keine Daten über die Rolle von TLR5 auf NG bei Infektion durch *P. aeruginosa*. Unsere Ergebnisse bei CF Patienten, die einer chronischen Infektion mit *P. aeruginosa* unterliegen, lassen uns vermuten, dass TLR5<sup>+</sup> NG eine wichtige Rolle bei der lokalen Immunantwort in der CF Lunge spielen könnte. NG in den CF Atemwegen zeigten eine höhere TLR5 Oberflächenexpression als bei gesunden Kontrollen. Deshalb nahmen wir an, dass die TLR5 Expression durch die Anwesenheit von bakteriellen oder anderen pro-inflammatorischen Stimuli *in vivo* in CF Atemwegen induziert wird. Unsere Daten zeigen, dass gerade TLR2 Liganden die Expression von TLR5 auf NG deutlich erhöhen. Dies könnte ein Hinweis auf TLR2 abhängige intrazelluläre Mechanismen sein, die die TLR5 Oberflächenexpression auf NG modulieren, was in zukünftigen Studien weiter untersucht werden sollte. Hayashi et al. fanden für TLR5 in NG auf mRNA Ebene nur eine mäßige Expression, während TLR1, TLR2 und TLR4 wesentlich höher exprimiert waren<sup>24</sup>. Im Gegensatz dazu zeigten unsere Daten eine relativ hohe Proteinexpression von TLR5 auf der Oberfläche von NG. TLR1, TLR2 und TLR4 dagegen waren auf Proteinebene nur sehr schwach exprimiert. Dies lässt sich möglicherweise durch die post-translationale Regulation vieler intrazellulär gespeicherter NG Rezeptoren erklären.

Fasst man die Daten früherer und unserer aktuellen Studien zusammen, so kommen wir zu folgendem hypothetischen Szenario: Wenn *P. aeruginosa* mit der Epithelbarriere der Atemwege in Berührung kommt, erkennt TLR5<sup>1;74</sup> auf Epithelzellen das Bakterium und setzen Chemokine frei, welche NG in die Atemwege rekrutieren<sup>4;63</sup>. Während NG in den Atemwegen nur geringe oder keine Oberflächenexpression von TLR1, 2 oder 4 aufweisen, ist die Expression von TLR5 erhöht. Dies ermöglicht ihnen die Erkennung des bakteriellen Flagellums. Da allerdings *P. aeruginosa* bei CF Patienten im fortgeschrittenen Stadium ihre Flagellen verlieren<sup>40</sup>, können die Bakterien über TLR5 auf NG häufig nicht mehr erkannt und eliminiert werden<sup>39</sup>. Weitere Studien sind allerdings notwendig um diesen Mechanismus genauer zu untersuchen. Neben *P. aeruginosa* werden die CF Atemwege auch durch andere Bakterien, wie z.B. *Staphylokokkus aureus*, infiziert, deren äußere Membran TLR2 Liganden enthält<sup>12</sup>. In unseren Versuchen induzierten die TLR2 Liganden LTA und insbesondere Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> bei der *in vitro* Stimulation von isolierten NG eine erhöhte TLR5 Expression. Da NG TLR2 exprimieren, spekulieren wir, dass TLR2 Liganden über die Bindung an TLR2 die TLR5 Expression von NG erhöhen und somit deren Antwort auf *P. aeruginosa* modulieren könnten.

Alles in allem deuten unsere Daten darauf hin, dass TLR5 eine ausschlaggebende Rolle bei der antibakteriellen Immunantwort *in vitro* und bei CF *in vivo* spielen könnte. Da die Lungen von CF Patienten chronisch durch *P. aeruginosa* kolonisiert werden, könnten TLR5<sup>+</sup> NG in CF

## DISKUSSION

Atemwegen einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt bei der NG-dominierten CF Lungenerkrankung darstellen.

### 6.4 Leukotrien B4 Rezeptor 1

Leukotrien B4 ist über die Bindung an BLT1 maßgeblich an der chemotaktischen Immunantwort des angeborenen Immunsystems und somit auch an der Mobilisation von NG beteiligt<sup>18;69</sup>. Es ist bekannt, dass BLT1 u.a. bei Patienten mit COPD<sup>5;41</sup>, wie z.B. Rauchern eine wichtige Rolle spielt. Beeh et al. haben gezeigt, dass es in den Atemwegen von COPD Patienten durch IL-8 und LTB4 zu einer verstärkten Immigration von NG und deren Aktivierung kommt<sup>5</sup>. Auch in der Asthmastikerlunge kommt es bei erhöhter Konzentration des Plättchenaktivierenden Faktors (PAF) zu einer Rekrutierung von NG und zu einer erhöhten Expression von BLT1 auf NG. Durch die Stimulation von isolierten NG durch PAF *in vitro* kam es zur endogenen Produktion von LTB4 und dadurch zur Aktivierung von BLT1<sup>20;21</sup> auf der NG Oberfläche. In der CF Lunge ist die Konzentration von LTB4 bei Infektion durch *P. aeruginosa* im Vergleich zu anderen Keimen und nicht-infizierten Patienten signifikant erhöht<sup>5;11</sup>. Entgegen den Erwartungen fanden wir im induzierten Sputum von CF Patienten eine geringere Expression von BLT1 auf NG als im peripheren Blut. Im Vergleich zu den gesunden Probanden zeigten CF Patienten jedoch sowohl im Blut als auch im induzierten Sputum eine erhöhte Expression von BLT1 auf NG. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass (i) CF Patienten per se eine erhöhte BLT1 Expression auf NG zeigen und dass (ii) lokale Faktoren in Atemwegen die BLT1 Expression auf NG herunterregulieren können.

Es stellte sich die Frage, was in der Lunge zu dieser erniedrigten Expression führen könnte. Bei Infektion der Atemwege von CF Patienten mit *P. aeruginosa* steigt der LTB4 Spiegel an<sup>11</sup>. In unserer Studie haben wir isolierte NG mit TLR Liganden behandelt und fanden, dass die Expression von BLT1 auf NG durch Stimulation mit LPS deutlich reduziert wird. Im Vergleich zu unbehandelten NG zeigte BLT1 nach Stimulation mit LPS nur noch ca. 20% der ursprünglichen Fluoreszenzintensität. Weitere TLR Liganden führten dagegen zu keiner signifikanten Veränderung der BLT1 Expression auf NG. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der TLR Ligand LPS aus *P. aeruginosa* einen möglichen Faktor für die verminderte BLT1 Expression auf NG in CF Atemwegen darstellen könnte. Da aber die BLT1 Expression von NG im Sputum von gesunden Probanden verglichen mit deren peripheren Blut ebenfalls erniedrigt war, müssen noch weitere Faktoren für diese Tatsache verantwortlich sein. Möglicherweise führt die Migration von NG aus dem Blut in die Atemwege zu einer Verminderung der BLT1 Expression. Detaillierte Studien sind notwendig, um diesen Sachverhalt zu klären.

### 6.5 Komplementrezeptoren

Die Komplementrezeptoren 1 (CD35/CR1) und 3 (CD11b/CR3b) sind maßgeblich an der Abwehr von systemischen Bakterien- und Pilzinfektionen durch NG beteiligt. Bei CD11b handelt es sich um ein  $\beta$ -Integrin das für die Adhäsion, Diapedese und Phagozytose der NG eine Rolle spielt. Es fungiert als Rezeptor für die Komplementkaskadenkomponente C3b<sup>60;61</sup>. Gespeichert in intrazellulären Granula unstimulierter NG liegt es unter physiologischen Bedingungen in äußerst geringer Expression in NG vor. Erst nach Aktivierung durch Pathogene bzw. deren Produkten steigt die CD11b Expression auf NG an<sup>8;9;10</sup>. Dieser rasche Anstieg nach Pathogenexposition macht CD11b zu einem Indikator für das Vorliegen einer Infektion bzw. Inflammation. Berger et al. haben gezeigt, dass CD11b auf NG in der BAL von CF Patienten sehr hoch exprimiert wird. Dies konnte *in vitro* durch Stimulation mit fMLP reproduziert werden<sup>10</sup>. Auch die Behandlung von isolierten NG durch weitere bakterielle Bestandteile führte *in vitro* zu einer erhöhten Expression von CD11b<sup>62</sup>.

In unserer Studie haben wir die Expression von CD11b auf NG im Sputum und peripheren Blut von CF Patienten mit entsprechenden Proben von gesunden Probanden verglichen. Dabei fanden wir eine signifikant höhere Expression von CD11b auf NG aus den Atemwegen von CF Patienten im Vergleich zu NG im Sputum und peripheren Blut der Kontrollgruppe. Die CD11b Expression auf NG im CF Blut unterschied sich dagegen nicht von der gesunder Patienten. Daneben haben wir isolierte NG *in vitro* mit bakteriellem Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> behandelt. Dabei fand sich eine um 100% erhöhte Expression von CD11b nach einstündiger Inkubation im Vergleich zu unstimulierten NG. Insofern korrelieren unsere Ergebnisse mit denen von Berger et al. Diese deuten darauf hin, dass die Aktivierung von NG durch fMLP oder TLR2 Liganden zu einer Erhöhung von CD11b auf NG führt, was eine Erklärung für die erhöhte CD11b Oberflächenexpression in CF Atemwegen sein könnte.

Im Gegensatz zu CD11b war bei Berger et al. die Expression von CD35 auf NG im CF BALF verglichen mit der *in vitro* Stimulation mit fMLP erniedrigt<sup>10</sup>. Über die spezifische Bindung an CD35 auf NG und auch Makrophagen opsoniert der Komplementfaktor C3b Partikel bei der Phagozytose. Dadurch ist CD35 maßgeblich bei der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Neutrophilen-, als auch *P. aeruginosa*-Elastase CD35, jedoch nicht CD11b auf NG *in vitro* spalten kann. Dabei ist die Elimination von Bakterien durch NG beeinträchtigt. Durch den Einsatz von Proteaseinhibitoren konnte *in vitro* der Verlust von CD35 verhindert werden<sup>60;61</sup>. Daraus lässt sich schließen, dass CD35 eine bedeutende Rolle bei durch CF verursachte Lungenerkrankungen spielen könnte.

## DISKUSSION

Wir haben die CD35 Expression auf NG im Sputum und peripheren Blut von CF Patienten mit gesunden Probanden verglichen. Dabei war die Expression von CD35 auf NG im CF Blut erhöht im Vergleich zu Sputum und Blut von Gesunden. In den Atemwegen von CF Patienten fand sich dagegen eine signifikant niedrigere Expression von CD35 auf NG verglichen mit der Kontrollgruppe und CF Blut. Wir vermuteten, dass neben Neutrophilen-, und. *P. aeruginosa*-Elastase noch weitere Faktoren am Verlust von CD35 auf NG in CF Atemwegen beteiligt sein könnten. Aus diesem Grund haben wir isolierte NG *in vitro* mit TLR Liganden behandelt. Dabei fanden wir, dass durch die Stimulation von isolierten NG mit bakteriellen CpG-Motiven die Expression von CD35 auf NG deutlich verringert wird. Somit könnte die TLR9 Aktivierung durch CpG-ODN einen weiteren Faktor für die verminderte CD35 Expression auf NG in der CF Lunge darstellen.

### 7. ZUSAMMENFASSUNG

Unsere Studie erbrachte folgende Ergebnisse:

- (i) TLR5 wird von NG auf Proteinebene deutlich höher exprimiert als TLR1, TLR2, TLR4 und TLR9. TLR5 wird von NG sowohl auf der Oberfläche als auch intrazellulär exprimiert. TLR5 zeigt somit unter allen TLR die höchste Proteinexpression auf NG.
- (ii) TLR5 und TLR9 werden auf NG in induziertem Sputum von CF Patienten signifikant höher exprimiert als auf NG im peripheren Blut.
- (iii) Die Oberflächenexpression von TLR5 auf Atemwegs-NG ist bei CF Patienten signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden, während TLR1, TLR2, TLR4 und TLR9 keine CF-spezifische Erhöhung auf Atemwegs-NG zeigen.
- (iv) Es finden sich erhöhte Prozentsätze von TLR5<sup>+</sup> NG in induziertem Sputum von CF Patienten im Vergleich zu Sputum von gesunden Probanden.
- (v) TLR2 Liganden und pro-inflammatorische Zytokine induzieren eine erhöhte Oberflächenexpression von TLR5 auf NG.
- (vi) Die Oberflächenexpression von BLT1 ist in induziertem Sputum von CF Patienten erhöht im Vergleich zu Sputum von gesunden Probanden. LPS reduziert *in vitro* die BLT1 Expression auf NG.
- (vii) Bei CF Patienten ist die Expression von CD11b in induziertem Sputum vermehrt, während die Expression von CD35 im Vergleich zu Sputum von gesunden Probanden vermindert ist. Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> induziert eine erhöhte Oberflächenexpression von CD11b auf NG. CpG-ODN reduzieren die Oberflächenexpression von CD35 auf NG.

Unsere Studie deutet zusammenfassend darauf hin, dass insbesondere TLR5 auf NG eine herausragende Rolle bei der antibakteriellen Immunabwehr von CF Patienten mit *P. aeruginosa* Infektion spielt. TLR5 auf NG könnte einen entscheidenden Krankheitsmarker und somit auch einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt bei der CF Lungenerkrankung darstellen. Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle von TLR5 bei CF weiter zu charakterisieren.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A. Pseudomonas aeruginosa flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:627-34.
2. Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, Lobet Y, Anguita J, Schoen RT, Medzhitov R, Fikrig E, Flavell RA. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in. *Nat Med* 2002;8:878-84.
3. Anderson C, Inhaber N, Menzies D. Comparison of sputum induction with fiber-optic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1570-1574.
4. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Gutierrez JP, Hull J, Olinsky A, Phelan EM, Robertson CF, Phelan PD. Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1197-204..
5. Beeh KM, Kornmann O, Buhl R, Culpitt SV, Giembycz MA, Barnes PJ. Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B4. *Chest* 2003;123:1240-1247.
6. Berger M. Inflammation in the Lung in Cystic-Fibrosis - A Vicious Cycle That Does More Harm Than Good. *Clinical Reviews in Allergy* 1991;9:119-42.
7. Berger M. Inflammatory mediators in cystic fibrosis lung disease. *Allergy Asthma Proc* 2002;23:19-25



## LITERATURVERZEICHNIS

8. Berger M, Dearborn D, Legris G, Doring G, Sorensen R. Complement Receptor Expression on Neutrophils (Pmn) in the Lung in Cystic-Fibrosis (Cf). *Pediatric Research* 1986;20:A305.
9. Berger M, O'Shea J, Cross AS, Folks TM, Chused TM, Brown EJ, Frank MM. Human neutrophils increase expression of C3bi as well as C3b receptors upon activation. *J Clin Invest* 1984;74:1566-71.
10. Berger M, Sorensen RU, Tosi MF, Dearborn DG, Doring G. Complement Receptor Expression on Neutrophils at An Inflammatory Site, the Pseudomonas-Infected Lung in Cystic-Fibrosis. *J Clin Invest* 1989;84:1302-13.
11. Bodini A, D'Orazio C, Peroni D, Corradi M, Folesani G, Baraldi E, Assael BM, Boner A, Piacentini GL. Biomarkers of neutrophilic inflammation in exhaled air of cystic fibrosis children with bacterial airway infections. *Pediatr Pulmonol* 2005;40:494-99.
12. Bubeck WJ, Williams WA, Missiakas D. Host defenses against Staphylococcus aureus infection require recognition of bacterial lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:13831-36.
13. Byrd-Leifer CA, Block EF, Takeda K, Akira S, Ding A. The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur J Immunol* 2001;31:2448-57.
14. Crooks SW, Stockley RA. Leukotriene B4. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:173-78.
15. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996;154:1229-56.

## LITERATURVERZEICHNIS

16. Devaney JM, Greene CM, Taggart CC, Carroll TP, O'Neill SJ, Mcelvaney NG. Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett* 2003;544:129-32.
17. Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, Prince A. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* 1998;66:43-51.
18. Ford-Hutchinson AW. Leukotrienes: their formation and role as inflammatory mediators. *Fed Proc* 1985;44:25-29.
19. Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. Leukotriene B<sub>2</sub>, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 1980;286:264-65.
20. Gabrijelcic J, Acuna A, Profita M, Paterno A, Chung KF, Vignola AM, Rodriguez-Roisin R. Neutrophil airway influx by platelet-activating factor in asthma: role of adhesion molecules and LTB<sub>4</sub> expression. *Eur Respir J* 2003;22:290-297.
21. Gaudreault E, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Involvement of leukotriene B<sub>4</sub> receptor 1 signaling in platelet-activating factor-mediated neutrophil degranulation and chemotaxis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005;75:25-34.
22. Guilbault C, Saeed Z, Downey GP, Radzioch D. Cystic fibrosis mouse models. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36:1-7.

## LITERATURVERZEICHNIS

23. Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 1998;17:6230-6240.
24. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003;102:2660-2669.
25. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410:1099-103.
26. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-745.
27. Islam SA, Thomas SY, Hess C, Medoff BD, Means TK, Brander C, Lilly CM, Tager AM, Luster AD. The leukotriene B4 lipid chemoattractant receptor BLT1 defines antigen-primed T cells in humans. *Blood* 2006;107:444-53.
28. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987-95.
29. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.

## LITERATURVERZEICHNIS

30. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:449-53.
31. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DWH. Early Pulmonary Inflammation in Infants with Cystic-Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1995;151:1075-82.
32. Konstan MW, Berger M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: Onset and etiology. *Pediatric Pulmonology* 1997;24:137-42.
33. Konstan MW, Hilliard KA, Norvell TM, Berger M. Bronchoalveolar Lavage Findings in Cystic-Fibrosis Patients with Stable, Clinically Mild Lung-Disease Suggest Ongoing Infection and Inflammation  
1. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1994;150:448-54.
34. Kronborg G, Hansen MB, Svenson M, Fomsgaard A, Hoiby N, Bendtzen K. Cytokines in sputum and serum from patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection as markers of destructive inflammation in the lungs. *Pediatr Pulmonol* 1993;15:292-97.
35. Krug A, Rothenfusser S, Selinger S, Bock C, Kerkmann M, Battiany J, Sarris A, Giese T, Speiser D, Endres S, Hartmann G. CpG-A oligonucleotides induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells. *J Immunol* 2003;170:3468-77.

## LITERATURVERZEICHNIS

36. Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger PE, Finberg RW. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* 2002;100:1860-1868.
37. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002;416:603-7.
38. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003;198:513-20.
39. Luzar MA, Montie TC. Avirulence and altered physiological properties of cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1985;50:572-76.
40. Luzar MA, Thomassen MJ, Montie TC. Flagella and motility alterations in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: relationship to patient clinical condition. *Infect Immun* 1985;50:577-82.
41. Marian E, Baraldo S, Visentin A, Papi A, Saetta M, Fabbri LM, Maestrelli P. Up-regulated membrane and nuclear leukotriene B4 receptors in COPD. *Chest* 2006;129:1523-30.
42. Martin TR, Frevert CW. Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:403-11.

## LITERATURVERZEICHNIS

43. Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1999;163:3920-3927.
44. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-97.
45. Miyahara N, Miyahara S, Takeda K, Gelfand EW. Role of the LTB<sub>4</sub>/BLT1 pathway in allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Allergol Int* 2006;55:91-97.
46. Morris MR, Doull IJ, Dewitt S, Hallett MB. Reduced iC3b-mediated phagocytotic capacity of pulmonary neutrophils in cystic fibrosis. *Clin Exp Immunol* 2005;142:68-75.
47. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000;164:5998-6004.
48. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000;164:558-61.
49. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13766-71.

## LITERATURVERZEICHNIS

50. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van HC, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-88.
51. Prince A. Flagellar activation of epithelial signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:548-51.
52. Pulendran B. Variegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *J Immunol* 2005;174:2457-65.
53. Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003;361:681-89.
54. Re F, Strominger JL. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2004;173:7548-55.
55. Sabroe I, Parker LC, Wilson AG, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptors: their role in allergy and non-allergic inflammatory disease. *Clin Exp Allergy* 2002;32:984-89.
56. Sagel SD, Kapsner R, Osberg I, Sontag MK, Accurso FJ. Airway inflammation in children with cystic fibrosis and healthy children assessed by sputum induction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2001;164:1425-31.
57. Sagel SD, Sontag MK, Wagener JS, Kapsner RK, Osberg L, Accurso FJ. Induced sputum inflammatory measures correlate with lung function in children with cystic fibrosis. *Journal of Pediatrics* 2002;141:811-17.

## LITERATURVERZEICHNIS

58. Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K, Golenbock DT. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med* 2001;194:79-88.
59. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999;274:17406-9.
60. Sengelov H. Complement receptors in neutrophils. *Crit Rev Immunol* 1995;15:107-31.
61. Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J Clin Invest* 1993;92:1467-76.
62. Soler-Rodriguez AM, Zhang H, Lichenstein HS, Qureshi N, Niesel DW, Crowe SE, Peterson JW, Klimpel GR. Neutrophil activation by bacterial lipoprotein versus lipopolysaccharide: differential requirements for serum and CD14. *J Immunol* 2000;164:2674-83.
63. Suttmoller RP, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, Joosten LA, Akira S, Netea MG, Adema GJ. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2006;116:485-94.
64. Tager AM, Luster AD. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;69:123-34.



## LITERATURVERZEICHNIS

65. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1-14.
66. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-76.
67. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999;11:443-51.
68. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002;169:10-14.
69. Toda A, Yokomizo T, Shimizu T. Leukotriene B4 receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:575-85.
70. Underhill DM. Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res* 2003;9:176-80.
71. Wine JJ. The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* 1999;103:309-12.
72. Yang IA, Fong KM, Holgate ST, Holloway JW. The role of Toll-like receptors and related receptors of the innate immune system in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006;6:23-28.
73. Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T. Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. *Arch Biochem Biophys* 2001;385:231-41.

## LITERATURVERZEICHNIS

74. Zhang Z, Louboutin JP, Weiner DJ, Goldberg JB, Wilson JM. Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5. *Infect Immun* 2005;73:7151-60.

### 9. TABELLENVERZEICHNIS

Tab.1: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden (Auswahl)

Tab.2: Patientendaten

### 10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1: Extrazelluläre und intrazelluläre TLR Expression auf NG im peripheren Blut

Abb.2: TLR Expression von NG im peripheren Blut und induziertem Sputum bei CF Patienten und gesunden Kontrollprobanden

Abb.3: TLR Expression im peripheren Blut und induzierten Sputum von CF Patienten

Abb.4: Lunge zu Blut Ratio bei CF Patienten und gesunden Kontrollen

Abb.5: TLR5<sup>+</sup> NG im induzierten Sputum bei CF Patienten und gesunden Kontrollprobanden

Abb.6: TLR5 Expression vor und nach Stimulation

Abb.7: TLR5 Expression nach Inkubation mit verschiedenen TLR Liganden

Abb.8: BLT1 Expression auf NG im peripheren Blut und induzierten Sputum bei CF Patienten und Kontrollprobanden

Abb.9: BLT1 Expression nach Inkubation mit verschiedenen TLR Liganden

Abb.10: CD11b Expression auf NG im induzierten Sputum und im peripheren Blut von CF Patienten und Kontrollprobanden

Abb.11: FACS Histogramm von CD11b

Abb.12: CD35 Expression auf NG im induzierten Sputum und im peripheren Blut von CF Patienten und Kontrollprobanden

Abb.13: FACS Histogramm von CD35

# DANKSAGUNG

## 11. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen unermüdlichen Betreuern Dominik Hartl und Matthias Griesse für die bestmögliche Betreuung, die sich ein Doktorand wünschen kann.

Ganz herzlich möchte ich auch meiner Freundin Carolin Wilhelm danken, ohne deren seelischen Beistand diese Arbeit nicht in dieser Form möglich gewesen wäre. Prof. Reinhardt und Prof. Roscher danke ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit am Forschungszentrum des Dr. v. Haunerschen Kinderspitals.

Herzlichen Dank auch an die MitarbeiterInnen der Christiane Herzog Ambulanz und der Immunologischen Abteilung für die zuverlässige Lieferung des Probenmaterials.

Der Arbeitsgruppe Rudolph danke ich für die freundliche Bereitstellung des FACS-Gerätes.

Meinen Mitdoktorandinnen Natalie Lehmann und Veronica Marcos Nickol möchte ich für die schöne Zusammenarbeit und Unterhaltung danken. Außerdem danke ich Stefanie Gruschka, Andrea Schams und Markus Woischnik für ihre technische Unterstützung.

# LEBENS LAUF

## 12. LEBENS LAUF

### **Persönliche Daten**

Name	Marcus Schreiner
Geburtsdatum	13.09.1976
Geburtsort	Deggendorf

### **Ausbildung**

06/1996	Abitur, Comenius Gymnasium Deggendorf
09/1996	Zivildienst, St. Notker Schule Deggendorf
03/1998	Praktikum und anschließende Ausbildung zum Zahntechniker
07/2001	Bestandene Gesellenprüfung und Übernahme als Zahntechnikergeselle
10/2002	Beginn des Zahnmedizinstudiums an der Ludwig Maximilian Universität (LMU) München
10/2003	Naturwissenschaftliche zahnärztliche Vorprüfung, LMU München
04/2005	Zahnärztliche Vorprüfung, LMU München
08/2007 – 01/2008	Zahnärztliche Prüfung
18.02.2008	Approbation als Zahnarzt

### **Dissertation**

06/2006 – 01/2007	Forschungsarbeit zum Thema „Toll-like Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit Cystischer Fibrose“, Forschungslabor Kubus, v. Haunersches Kinderspital, LMU München
-------------------	--